

**Der Einfluß des Phenylbutazons
auf das Farbstoff-Hyaluronidase-
Spreading in Abhängigkeit
von der Dosierung**

MAHENDRA NATH

1967

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

(Direktor: Professor Dr. W. Seitz)

Der Einfluß des Phenylbutazons auf das Farbstoff-
Hyaluronidase-Spreading in Abhängigkeit von der
Dosierung

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt

von

Mahendra Nath

aus

Ataria / Indien

München 1968

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Priv. Doz. Dr. H. Mathies
Coreferent:	Prof. Dr. W. Seitz
Dekan:	Prof. Dr. M. Kiese
Tag der mündlichen Prüfung:	18. 7. 1967



In großer Dankbarkeit
Dem Deutschen Volk
Meinem Vater

INHALTSVERZEICHNIS

Problematik	1
eigene Versuche	3
Methodik	3
Versuchsreihen	6
Berechnung und statische Auswertung	23
Diskussion	37
Zusammenfassung	38
Literaturverzeichnis	39

PROBLEMATIK

Mathies und Mitarbeiter¹⁻⁸ haben in früheren Versuchsreihen an Ratten die Wirkungsweise hyaluronidasehemmender Substanzen am Beispiel der Salicylate, des Phenylbutazons, der Cortisonderivate sowie der Moor- und Schwefelbäder darzustellen versucht. Diese Versuche wurden mit Hilfe des Farbstoff-Hyaluronidase-Spreadings durchgeführt, das besagt, daß eine durch Hyaluronidase gesteigerte Ausbreitung einer intracutan injizierten Farbstofflösung durch die hyaluronidasehemmende Wirkung der oben untersuchten Substanzen wieder gehemmt werden kann. Zur Aufklärung der Wirkungsweise der in vivo hyaluronidasehemmend wirkenden Substanzen wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Es ergaben sich dabei folgende Tatsachen. Die hyaluronidase-spreading-hemmende Wirkung bleibt bei adrenaletomierten Tieren aus^{1, 2, 4, 5, 9}. Folglich war anzunehmen, daß die Nebenniere eine wichtige Rolle beim Zustandekommen dieser Hyaluronidasehemmung spielt, ohne daß zunächst zu differenzieren war, ob die Rinde oder das Mark den entscheidenden Anteil darstellt. Durch Arbeiten von Doménjoz¹⁰ und Mathies⁹ konnte gezeigt werden, daß der Ascorbin-Depletionseffekt nach Gabe der genannten hyaluronidasehemmenden Stoffe bedeutend abnimmt. Sayers und Sayers¹¹ deuten dies als Ausdruck einer inkretorischen Aktivität der Nebennierenrinde. Diese Nebennierenrinden-Stimulierung bleibt bei hypophysektomierten Ratten aus^{9, 10}. Diese Versuchsergebnisse beweisen also, daß die geprüften hyaluronidasehemmenden Substanzen eine Aktivierung der Nebennierenrinde bewirken. Auf der anderen Seite zeigte sich nun, daß, obwohl die Nebennierenrinden-Stimulierung bei hypophysektomierten Tieren ausbleibt, der hyaluronidasehemmende Effekt auf das Farbstoff-Hyaluronidase-Spreading erhalten bleibt^{2, 12}. Somit kann also die nebennierenrinden-stimulierende Wirkung der hyaluronidasehemmenden Substanzen keine Bedeutung für das Hyaluronidase-Spreading besitzen. Daher war eine Beteiligung des Nebennierenmarks im Wirkungsmechanismus hyaluronidasehemmender Substanzen zu diskutieren. Arbeiten von Mathies und Mitarbeiter^{3, 13, 14} stützten diese Vermutung, nach denen die Nebennierenkatecholamine Adrenalin und Noradrenalin nicht nur bei intakten Tieren, sondern auch bei adrenaletomierten Tieren eine Hemmung des Farbstoff-Hyaluronidase-Spreadings bedingen, die quantitativ der hemmenden Wirkung antirheumatischer Substanzen vergleichbar ist. Die hyaluronidasehemmende Wirkung des Adrenalins und Nordadrenalins wird ferner auch durch Adrenolytika blockiert, wie auch bei Salicylaten, beim Phenylbutazon und bei Moor-Bade-Applikation festgestellt werden konnte³. Die Überprüfung des Einflusses von Ganglienblockern auf den hyaluronidasehemmenden Effekt der einzelnen Substanzen schien daher besonders interessant zu sein. Es zeigte sich, daß Ganglienblocker (Pendiomid) die hyaluronidasehem-

mende Wirkung der genannten Substanzen aufheben, wohingegen die hyaluronidasehemmende Wirkung des Adrenalins und Noradrenalins unbeeinflusst bleibt^{15, 16}. Somit blockieren die Ganglienblocker also das Nebennierenmark, das ja ein differenziertes Ganglion darstellt, während eine blockierende Wirkung auf die peripheren Ganglien hinsichtlich des Wirkungsablaufs hyaluronidasehemmender Substanzen vermutlich keine Rolle spielt. Nach all diesen Versuchen war anzunehmen, daß die hyaluronidasehemmenden Substanzen über eine Aktivierung des Nebennierenmarkes wirken. Somit liegt also nur eine in vivo ablaufende und spezifische, hyaluronidasehemmende Wirkung der genannten Substanzen vor. Zunächst schien aus diesem Grunde auch eine hemmende Wirkung am Injektionsort selbst, z. B. bei Zugabe der hemmenden Substanz zur Farbstoff-Hyaluronidase-Lösung, nicht zu bestehen. Es zeigte sich jedoch, daß auch bei einer derartigen Versuchsanordnung Phenylbutazon in relativ geringer Dosierung eine Verminderung der Ausbreitung der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel bewirkt¹⁷. Zur Diskussion stand nun, ob das Phenylbutazon nicht am Ort der Injektion, sondern ebenfalls auf dem Umweg über eine Nebennierenmarks-Stimulierung wirkt. Um eine Aussage über einen derartigen Wirkungsmechanismus machen zu können, war die Bestimmung der geringsten hyaluronidasehemmenden Wirkung des Phenylbutazons bei intraperitonealer Injektion zu bestimmen, um zu sehen, ob eine Nebennierenmark-Wirkung der in die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel injizierten Phenylbutazonmenge möglich erscheint.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die geringste, wirksame Phenylbutazon-Dosis auszutesten. Die Ergebnisse sollten gleichzeitig Aufschluß darüber geben, in welchen Mengen Phenylbutazon, als Salbenapplikation wirkend, resorbiert wird. Denn Versuche mit cutaner Applikation einer Phenylbutazon-Salbe mit einem Gehalt von 150 mg pro Applikation bei 200 g schweren Ratten hatten eine sichtbare Hemmung des Farbstoff-hyaluronidase-Spreadings ergeben. Bei diesen Versuchen war eine lokale Wirkung des Phenylbutazons dadurch ausgeschlossen worden, daß die Salbe auf die Brusthaut appliziert wurde und die Farbstoffausbreitung im Spreading-Test auf der Bauchhaut nach Durchtrennung von Brust- und Bauchhaut gemessen wurde.

EIGENE VERSUCHE

Methodik

Für alle Versuchsreihen wurden männliche weiße Ratten mit einem Gewicht zwischen 160 g und 220 g verwendet. Die Versuche wurden nach anfänglichem Ät-herrausch in kombinierter Evipan-Luminal-Narkose durchgeführt (20 mg Evipan-Na/100 g Tier und 8,8 mg Luminal/ 100 g Tier). Die Hyaluronidaseaktivität wur-de an der Ausbreitung einer Farbstoff- bzw. Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel vor und zu den verschiedenen Zeiten nach der Applikation des Phenylbutazons ermit-telt. Hierzu mußte vor dem Versuch die Bauchhaut der Tiere mit Pilca enthaart werden. Die reine Farbstoff-Quaddel wurde mit 0,1 ccm einer 1%-igen Verdün-nung einer 6%-igen Evansblue-Stammlösung gesetzt. Die Farbstoff-Hyaluronidase-Lösung wurde aus einer Trockenampulle Hyaluronidase (Kinetin) - 150 IE in 2 ccm der obigen Evansblue-Lösung (1 % der 6%-igen Stammlösung) gelöst - hergestellt, so daß bei einer Injektion von 0,1 ccm 7,5 IE Hyaluronidase zur Wirkung kamen. Die Quaddeln wurden streng intracutan gesetzt. 10 Minuten nach Setzen der Quad-del wurde die Diffusionsgeschwindigkeit des Farbstoffes, bzw. des Farbstoff-Hya-luronidase-Gemisches durch die Ausbreitung der Quaddel registriert, indem die äußersten Konturen auf einen Zelluloidstreifen übertragen und danach planimet-risch ausgemessen wurden. Weitere Quaddelpaare obiger Lösung wurden zu ver-schiedenen Zeiten nach Injektion der auf die Hyaluronidasehemmung zu prüfen-den Substanz Phenylbutazon in verschiedenen Verdünnungen gesetzt und jeweils nach 10 Minuten abgelesen. Normalerweise zeigt die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel eine weit raschere Ausbreitung als die reine Farbstoff-Quaddel; dagegen zeigt die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel eine gewisse Hemmung der Ausbrei-tung, wenn vorher eine hyaluronidasehemmende Substanz (z.B. Phenylbutazon) appliziert wird. Die hyaluronidasehemmende Substanz Phenylbutazon wurde in den verschiedenen, auszutestenden Verdünnungen intraperitoneal injiziert und nach bestimmten Einwirkungszeiten durch Farbstoff- und Farbstoff-Hyaluronida-se-Quaddeln auf ihre noch bestehende Aktivität getestet. Jede Versuchsreihe be-stand aus 6 Ratten möglichst gleichen Gewichtes. (Nur bei den Versuchsreihen IVa und IVb wurden je 5 Ratten verwendet). Die Versuche wurden: nach dem lateini-schen Quadrat geplant, um etwaige Lokalisationseinflüsse erkennen und eliminie-ren zu können.

I. Versuchsteihe

Es wurden zunächst reine Farbstoff-Quaddeln und Farbstoff-hyaluronidase-Quaddeln in oben angegebener Zusammensetzung, bzw. Verdünnung gesetzt und deren Ausbreitung nach 10 Minuten ausgemessen. Sodann wurde 1 mg Phenylbutazon/100 g Tier intraperitoneal injiziert, 40 und 60 Minuten (Versuchsreihe Ia), 90 und 120 Minuten (Versuchsreihe Ib) und 150 und 180 Minuten (Versuchsreihe Ic) nach Applikation wurde erneut ein Farbstoff- und Farbstoff-hyaluronidase-Quaddel-Paar gesetzt, deren Ausbreitung ebenfalls nach 10 Minuten in oben genannter Weise ausgemessen wurde (Siehe Tabellen 1 - 3).

II. Versuchsteihe

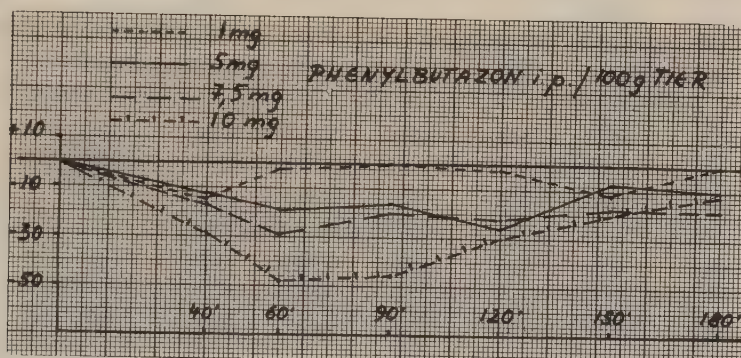
Nach Setzen eines Leerquaddelpaares und Messung der Ausbreitung nach 10 Minuten wurden 5 mg Phenylbutazon/100 g Ratte intraperitoneal verabreicht und sodann nach 40 und 60 Minuten (Versuchsreihe IIa), 90 und 120 Minuten (Versuchsreihe IIb) und 150 und 180 Minuten (Versuchsreihe IIc) erneut Farbstoff- und Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel-Paare gesetzt und deren Ausbreitung wiederum nach 10 Minuten festgehalten (Siehe Tabellen 4 - 6).

III. Versuchsreihe

Die Methodik blieb die gleiche wie bei den vorangegangenen Versuchsreihen, nur wurden in dieser Reihe 7,5 mg Phenylbutazon/100 g Tier intraperitoneal appliziert und in oben angesetzten Zeitabständen der Einfluß auf die Ausbreitung der Quaddel-Paare aufgezeigt (Siehe Tabellen 7 - 9).

IV. Versuchsreihe

Nach oben beschriebener Methode wurde auch in dieser Versuchsreihe verfahren. Es wurden hierbei 10 mg Phenylbutazon/100 g Tier intraperitoneal verabreicht (bei Versuchsreihe IVa und IVb je 5 Ratten, bei Versuchsreihe IVc 6 Ratten) und der Einfluß auf Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel-Ausbreitung wiederum nach den oben angegebenen Zeitabständen ausgetestet (Siehe Tabellen 10 - 12).

Mittelwertsdifferenzkurven für alle Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddeln

Versuchsreihe Ia: 1 mg Phenylbutazon i.p./100 g Tier
(40' und 60')

Tier	Gewicht g	F mm ²	FH	F ₄₀	FH ₄₀	F ₆₀	FH ₆₀
I	180	90	160	90	145	105	175
II	190	90	170	85	145	100	155
III	180	110	170	95	150	90	150
IV	180	90	160	100	170	90	140
V	180	85	150	90	150	105	180
VI	170	85	160	80	130	105	160
Mittelwerte		92	162	90	148	99	160

Tabelle 1:

Tier	Lokalisation der Quaddeln					
	1	2	3	4	5	6
I	FH	F	F ₄₀	F ₆₀	FH ₄₀	FH ₆₀
II	F ₆₀	F ₄₀	FH ₄₀	F	FH ₆₀	FH
III	F	FH ₄₀	FH ₆₀	F ₄₀	FH	F ₆₀
IV	F ₄₀	FH ₆₀	FH	FH ₄₀	F ₆₀	F
V	FH ₄₀	FH	F ₆₀	FH ₆₀	F	F ₄₀
VI	FH ₆₀	F ₆₀	F	FH	F ₄₀	FH ₄₀

Versuchsreihe Ib: 1 mg Phenylbutazon i.p. / 100 g Tier
(90' und 120')

Tier	Gewicht g	F mm ²	FH	F ₉₀	FH ₉₀	F ₁₂₀	FH ₁₂₀
I	190	80	145	90	125	95	140
II	180	80	150	100	150	105	155
III	190	105	170	95	165	85	155
IV	180	105	160	95	170	80	140
V	210	90	140	95	140	100	170
VI	190	95	150	95	165	105	145
Mittelwerte		93	153	95	153	95	151

Tabelle 2:

Tier	Lokalisation der Quaddeln					
	1	2	3	4	5	6
I	F	FH	FH ₁₂₀	F ₁₂₀	F ₉₀	FH ₉₀
II	F ₉₀	FH ₁₂₀	F ₁₂₀	F	FH ₉₀	FH
III	FH ₉₀	F ₁₂₀	F	F ₉₀	FH	FH ₁₂₀
IV	FH	F	F ₉₀	FH ₉₀	FH ₁₂₀	F ₁₂₀
V	FH ₁₂₀	F ₉₀	FH ₉₀	FH	F ₁₂₀	F
VI	F ₁₂₀	FH ₉₀	FH	FH ₁₂₀	F	F ₉₀

Versuchsreihe Ic: 1 mg Phenylbutazon i. p. / 100 g Tier
(150' und 180')

Tier	Gewicht g	F mm ²	FH	F ₁₅₀	FH ₁₅₀	F ₁₈₀	FH ₁₈₀
I	170	115	170	100	170	120	180
II	180	120	190	95	170	110	185
III	160	125	160	115	150	115	170
IV	160	100	185	100	190	120	220
V	160	110	200	100	170	100	160
VI	160	110	200	120	180	115	190
Mittelwerte		113	184	105	172	113	184

Tabelle 3:

Tier	Lokalisation der Quaddeln					
	1	2	3	4	5	6
I	FH ₁₅₀	F	FH	F ₁₈₀	FH ₁₈₀	F ₁₅₀
II	F ₁₅₀	F ₁₈₀	FH ₁₈₀	FH ₁₅₀	F	FH
III	FH	FH ₁₅₀	F	F ₁₅₀	F ₁₈₀	FH ₁₈₀
IV	FH ₁₈₀	F ₁₅₀	F ₁₈₀	FH	FH ₁₅₀	F
V	F	FH	FH ₁₅₀	FH ₁₈₀	F ₁₅₀	F ₁₈₀
VI	F ₁₈₀	FH ₁₈₀	F ₁₅₀	F	FH	FH ₁₅₀

Versuchsreihe IIa: 5 mg Phenylbutazon i.p. / 100 g Tier
(40' und 60')

Tier	Gewicht g	F mm ²	FH	F ₄₀	FH ₄₀	F ₆₀	FH ₆₀
I	210	90	165	85	155	95	145
II	210	85	155	85	145	95	145
III	200	90	160	95	155	100	145
IV	220	90	175	80	160	85	140
V	180	85	160	95	145	85	145
VI	220	90	175	100	155	95	155
Mittelwerte		88	165	90	153	93	146

Tabelle 4:

Tier	Lokalisation der Quaddeln					
	1	2	3	4	5	6
	FH	F ₆₀	F	FH ₄₀	F ₄₀	FH ₆₀
I	F ₄₀	F	FH ₆₀	FH	F ₆₀	FH ₄₀
II	F ₆₀	FH ₆₀	FH ₄₀	F ₄₀	F	FH
V	F	FH ₄₀	FH	F ₆₀	FH ₆₀	F ₄₀
	FH ₆₀	FH	F ₄₀	F	FH ₄₀	F ₆₀
I	FH ₄₀	F ₄₀	F ₆₀	FH ₆₀	FH	F

Versuchsreihe IIb: 5 mg Phenylbutazon i. P. / 100 g Tier
(90' und 120')

Tier	Gewicht g	F ₂ mm ²	FH	F ₉₀	FH ₉₀	F ₁₂₀	FH ₁₂₀
I	200	90	160	95	140	90	140
II	190	85	170	85	160	80	140
III	210	95	180	100	165	90	155
IV	200	80	165	75	155	80	140
V	190	90	170	80	155	85	150
VI	180	80	175	80	150	90	140
Mittelwerte		87	170	86	154	86	144

Tabelle 5:

Tier	Lokalisation der Quadeln					
	1	2	3	4	5	6
I	F	F ₉₀	FH ₁₂₀	F ₁₂₀	FH	FH ₉₀
II	F ₁₂₀	FH	F ₉₀	FH ₁₂₀	FH ₉₀	F
III	FH ₁₂₀	FH ₉₀	FH	F ₉₀	F	F ₁₂₀
IV	F ₉₀	F	FH ₉₀	FH	F ₁₂₀	FH ₁₂₀
V	FH	F ₁₂₀	F	FH ₉₀	FH ₁₂₀	F ₉₀
VI	FH ₉₀	FH ₁₂₀	F ₁₂₀	F	F ₉₀	FH

Versuchsreihe IIc: 5 mg Phenylbutazon i.p./ 100 g Tier
(150' und 180')

Tier	Gewicht g	F mm ²	FH	F ₁₅₀	FH ₁₅₀	F ₁₈₀	FH ₁₈₀
I	170	120	170	100	170	110	160
II	160	110	190	90	185	95	195
III	170	115	190	105	185	115	180
IV	160	120	200	120	170	125	180
V	160	125	185	120	175	100	170
VI	160	125	195	120	200	110	180
Mittelwerte		119	188	109	181	109	178

Tabelle 6:

Tier	Lokalisation der Quaddeln					
	1	2	3	4	5	6
I	FH ₁₈₀	FH ₁₅₀	F	F ₁₅₀	FH	FH ₁₈₀
II	FH ₁₅₀	F ₁₈₀	FH ₁₈₀	F	F ₁₅₀	FH
III	F ₁₈₀	FH	FH ₁₅₀	FH ₁₈₀	F	F ₁₅₀
IV	FH	F ₁₅₀	F ₁₈₀	FH ₁₅₀	FH ₁₈₀	F
V	F ₁₅₀	F	FH	F ₁₈₀	FH ₁₅₀	FH ₁₈₀
VI	F	FH ₁₈₀	F ₁₅₀	FH	F ₁₈₀	FH ₁₅₀

Versuchsreihe III a: 7,5 mg Phenylbutazon i.p. / 100 g Tier
(40' und 60')

Tier	Gewicht g	F _{mm} ²	FH	F ₄₀	FH ₄₀	F ₆₀	FH ₆₀
I	180	110	190	120	160	125	160
II	180	120	180	120	175	115	140
III	160	115	195	135	185	125	165
IV	160	110	180	115	160	100	160
V	160	100	180	110	170	115	140
VI	170	125	170	115	160	110	160
Mittelwerte		113	183	119	168	115	154

Tabelle 7:

Tier	Lokalisation der Quaddeln					
	1	2	3	4	5	6
I	F	F ₆₀	FH	FH ₆₀	F ₄₀	FH ₄₀
II	F ₄₀	F	F ₆₀	FH	FH ₄₀	FH ₆₀
III	FH ₄₀	F ₄₀	F	F ₆₀	FH ₆₀	FH
IV	FH ₆₀	FH ₄₀	F ₄₀	F	FH	F ₆₀
V	FH	FH ₆₀	FH ₄₀	F ₄₀	F ₆₀	F
VI	F ₆₀	FH	FH ₆₀	FH ₄₀	F	F ₄₀

Versuchsreihe III b: 7,5 mg Phenylbutazon i. p. / 100 g Tier
(90' und 120')

Tier	Gewicht g	F mm ²	FH	F ₉₀	FH ₉₀	F ₁₂₀	FH ₁₂₀
I	160	110	180	120	150	100	165
II	160	105	170	90	170	100	150
III	160	120	190	110	170	100	160
IV	160	110	180	120	160	110	150
V	160	105	175	110	150	115	160
VI	170	120	185	115	160	110	160
Mittelwerte		112	180	111	160	106	158

Tabelle 8:

Tier	Lokalisation der Quaddeln					
	1	2	3	4	5	6
	FH ₁₂₀	F ₁₂₀	F	F ₉₀	FH ₉₀	FH
I	FH ₉₀	FH	F ₁₂₀	FH ₁₂₀	F	F ₉₀
II	F	F ₉₀	FH	FH ₉₀	F ₁₂₀	FH ₁₂₀
V	F ₁₂₀	FH ₁₂₀	F ₉₀	F	FH	FH ₉₀
V	FH	FH ₉₀	FH ₁₂₀	F ₁₂₀	F ₉₀	F
I	F ₉₀	F	FH ₉₀	FH	FH ₁₂₀	F ₁₂₀

Versuchsreihe IIIc: 7,5 mg Phenylbutazon i.p. / 100 g Tier
(150' und 180')

Tier	Gewicht g	F _{mm²}	FH	F ₁₅₀	FH ₁₅₀	F ₁₈₀	FH ₁₈₀
I	180	105	200	100	180	100	200
II	180	120	200	110	180	110	160
III	160	120	200	110	180	100	190
IV	180	100	190	100	190	120	180
V	160	110	200	120	185	100	160
VI	160	110	200	100	170	105	160
Mittelwerte		110	198	107	181	105	180

Tabelle 9:

Tier	Lokalisation der Quaddeln					
	1	2	3	4	5	6
I	F	FH	FH ₁₅₀	F ₁₅₀	FH ₁₈₀	F ₁₈₀
II	FH	FH ₁₅₀	F ₁₈₀	FH ₁₈₀	F	F ₁₅₀
III	FH ₁₅₀	F ₁₈₀	F ₁₅₀	F	FH	FH ₁₈₀
IV	F ₁₈₀	F ₁₅₀	FH ₁₈₀	FH	FH ₁₅₀	F
V	F ₁₅₀	FH ₁₈₀	F	FH ₁₅₀	F ₁₈₀	FH
VI	FH ₁₈₀	F	FH	F ₁₈₀	F ₁₅₀	FH ₁₅₀

Versuchsreihe IVa: 10 mg Phenylbutazon i.p. / 100 g Tier
(40' und 60')

Tier	Gewicht g	F mm ²	FH	F ₄₀	FH ₄₀	F ₆₀	FH ₆₀
I	205	142	233	141	212	133	186
II	215	142	245	145	213	148	198
III	210	145	233	136	209	148	192
IV	165	145	246	138	214	154	196
V	160	159	256	156	225	153	200
VI							
Mittelwerte		147	243	143	215	147	194

Tabelle 10:

Tier	Lokalisation der Quaddeln					
	1	2	3	4	5	6
I						
II						
III						
IV						
V						
VI						

Versuchsreihe IV b: 10 mg Phenylbutazon i. p. / 100 g Tier
(90' und 120')

Tier	Gewicht g	F mm ²	FH	F ₉₀	FH ₉₀	F ₁₂₀	FH ₁₂₀
I	175	160	200	140	165	154	181
II	160	155	199	143	168	152	172
III	170	158	223	137	171	141	182
IV	200	155	228	137	187	143	201
V	155	143	229	139	160	137	196
VI							
Mittelwerte		154	216	139	170	145	186

Tabelle 11:

Tier	Lokalisation der Quaddeln					
	1	2	3	4	5	6
I						
II						
III						
IV						
V						
VI						

Versuchsreihe IV c: 10 mg Phenylbutazon i. p. / 100 g Tier
(150' und 180')

Tier	Gewicht g	F mm ²	FH	F ₁₅₀	FH ₁₅₀	F ₁₈₀	FH ₁₈₀
I	160	100	160	95	150	95	175
II	160	120	190	90	150	80	150
III	160	95	190	100	150	90	170
IV	160	110	170	125	170	110	180
V	160	90	170	110	175	90	170
VI	160	120	190	120	155	110	150
Mittelwert		106	178	107	158	96	166

Tabelle 12:

Tier	Lokalisation der Quaddeln					
	1	2	3	4	5	6
I	F	FH ₁₈₀	F ₁₈₀	FH	FH ₁₅₀	F ₁₅₀
II	F ₁₈₀	FH	FH ₁₈₀	F ₁₅₀	F	FH ₁₅₀
III	FH ₁₈₀	F ₁₅₀	FH	FH ₁₅₀	F ₁₈₀	F
IV	FH	FH ₁₅₀	F ₁₅₀	F	FH ₁₈₀	F ₁₈₀
V	F ₁₅₀	F	FH ₁₅₀	F ₁₈₀	FH	FH ₁₈₀
VI	FH ₁₅₀	F ₁₈₀	F	FH ₁₈₀	F ₁₅₀	FH

Berechnung der prozentualen Hemmung

Zur Berechnung der prozentualen Hemmung der Hyaluronidaseaktivität wurde davon ausgegangen, daß die Ausbreitung der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel vor Gabe der untersuchten Substanz einer 0%-igen Hemmung gleichzusetzen ist. Die Farbstoff-Quaddel ohne Hyaluronidasebeimengung entspricht einer 100%igen Hemmung, da die Ausbreitung einer Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel mit vollständig gehemmter Hyaluronidaseaktivität den gleichen Flächeninhalt aufweisen würde. Auf diese beiden Fixpunkte wurde die Flächenausbreitung der Farbstoff- und Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel zu den verschiedenen Zeiten nach Gabe der untersuchten Substanz bezogen und prozentual berechnet. Die Farbstoff-Quaddel nach Gabe von Phenylbutazon diente der statistischen Feststellung, inwieweit auch diese eine Änderung ihrer Flächenausbreitung erfährt, und ob der hemmende Effekt gegebenenfalls als unspezifisch bezeichnet werden muß, wobei allerdings ein etwaiger Einfluß auf die natürliche Gewebshyaluronidase ebenfalls zu berücksichtigen wäre. Die statistische Auswertung (s. u.) hat jedoch ergeben, daß nur ein geringer Einfluß auf die Ausbreitung der reinen Farbstoff-Quaddel besteht.

Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

1. Statistische Methodik

Entsprechend dem Vorgehen bei früheren Arbeiten analoger Fragestellung, sind wir bei der statistischen Auswertung hier besprochener Versuche von einem linearen statistischen Modell ausgegangen. Bezeichnet man die 6 verschiedenen Quaddel-Arten, die während des Versuches gesetzt werden, als die 6 Verfahren des Versuches, so wird in dem linearen statistischen Modell angenommen, daß der Meßwert x_{ik} vom i -ten Tier mit dem k -ten Verfahren in 1. Nahrung wie folgt dargestellt werden kann:

$$x(j)_{ik} = T_i + V_k + L_j + m + e_{ik}.$$

Hierin bedeutet T_i eine Konstante, die nur von dem i -ten Versuchstier abhängt, V_k eine Konstante, die nur von dem k -ten Verfahren abhängt und L_j eine Konstante, die nur von der j -ten Lokalisation der Quaddel auf dem Versuchsfeld (der Bauchhaut der Versuchstiere) abhängt. m ist eine universelle Konstante, die nur aus Gründen der statistischen Methodik eingeführt wird, und die keinerlei Bedeutung für die Interpretation der Versuche hat. e_{ik} ist der "Versuchsfehler", d. h. die Abweichung zwischen dem tatsächlichen, beobachteten Wert und demjenigen Wert, der auf Grund des statistischen Modelles zu erwarten ist: sogenannter "Erwartungswert".

dem Versuchsfehler e_{ik} wird angenommen, daß er eine Zufallsvariable darstellt, deren Verteilung unabhängig von den Versuchstieren, den Verfahren und Lokalisationen ist; es wird angenommen, daß die Verteilung dieser Zufallsvariablen eine Normalverteilung mit dem Erwartungswert 0 und der Varianz σ^2 ist.

Die Schätzung des Versuchsfehlers, d.h. der Varianz σ^2 , erfolgt mit Hilfe von Varianz-Analysen. Die Rest-Varianz dieser Varianz-Analysen stellt die Schätzung des Versuchsfehlers dar. In den Varianz-Analysen werden außerdem die nachstehenden Hypothesen geprüft.

Hypothese H_1 : Es bestehen keine Unterschiede zwischen den individuellen Reaktionsniveaux der einzelnen Versuchstiere, d.h. es ist

$$T_1 = T_2 = T_3 = T_4 = T_5 = T_6.$$

Diese Hypothese wird mit Hilfe der Varianz-Komponente "Zwischen Tieren" geprüft.

Hypothese H_2 : Es bestehen keine Unterschiede zwischen den Wirkungen der einzelnen Verfahren, d.h. es ist

$$V_1 = V_2 = V_3 = V_4 = V_5 = V_6.$$

Diese Hypothese wird mit Hilfe der Varianz-Komponente "Zwischen Verfahren" geprüft.

Hypothese H_3 : Die Lokalisationen innerhalb des Versuchsfeldes haben keinen Einfluß auf den Ausgang des Versuches, d.h. es ist

$$L_1 = L_2 = L_3 = L_4 = L_5 = L_6.$$

Die Prüfung dieser Hypothese erfolgt mit Hilfe der Varianz-Komponente "Zwischen Lokalisationen".

Im einzelnen erfolgt die Prüfung der Hypothesen durch Vergleich der angegebenen Varianz-Komponenten mit dem "Versuchsfehler", d.h. mit der Rest-Varianz. Der Vergleich dieser beiden Varianz-Komponenten wird mit Hilfe des F-Tests (Varianz-Quotienten-Test) durchgeführt. Die Hypothesen werden nur dann verworfen, wenn der errechnete Varianz-Quotient in der zugehörigen F-Prüfverteilung eine Überschreitungswahrscheinlichkeit besitzt, die mindestens 5% beträgt. Diese Überschreitungswahrscheinlichkeit ist zugleich die Irrtumswahrscheinlichkeit mit der behauptet wird, die betreffende Hypothese treffe nicht zu. Im einzelnen interpretieren wir die Irrtumswahrscheinlichkeit wie folgt:

- 5 %: schwache statistische Sicherung; kann nur als Hinweis aufgefaßt werden;
- 1 %: ausreichende statistische Sicherung;
- 0,1 %: hohe statistische Sicherung.

Am wesentlichsten für die statistische Interpretation der Versuchsergebnisse, ist die Aussage über die Hypothese H_2 . Führt die Varianz-Analyse zur Verwerfung dieser Hypothese, so muß durch die Prüfung von zusätzlichen Hypothesen untersucht werden, in welcher Weise sich die 6 Verfahren des Versuches unterscheiden. Zur Formulierung dieser Hypothesen führen wir für die Parameter, welche die Wirkung der Verfahren charakterisieren, neue Bezeichnungen ein. Für die reine Farbstoff-Quaddel soll bedeuten: $V_k^{(E)}$ den Parameter, welcher das Verhalten der Kontroll-Quaddel charakterisiert, $V_1^{(E)}$ den Parameter, welcher das Verhalten der Farbstoff-Quaddel zur ersten Versuchszeit charakterisiert und $V_2^{(E)}$ den Parameter, welcher das Verhalten der Farbstoff-Quaddel zur zweiten Versuchszeit charakterisiert.

$V_k^{(H)}$, $V_1^{(H)}$, $V_2^{(H)}$ sollen die entsprechende Bedeutung für die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel haben. Es wird nun angenommen, daß jeder dieser 6 Parameter sich selber additiv aus weiteren Parametern zusammensetzt, und zwar in folgender Weise:

$$V_k^{(E)} = V^{(E)} + V_k^{(E)};$$

$$V_k^{(H)} = V^{(H)} + V_k^{(H)}$$

$$V_1^{(E)} = V^{(E)} + V_T^{(E)} + V_1^{(E)};$$

$$V_1^{(H)} = V^{(H)} + V_T^{(H)} + V_1^{(H)}$$

$$V_2^{(E)} = V^{(E)} + V_T^{(E)} + V_2^{(E)};$$

$$V_2^{(H)} = V^{(H)} + V_T^{(H)} + V_2^{(H)}$$

Mit Hilfe dieser Zerlegung der Parameter, welche in die Hypothese H_2 eingehen, werden neue Hypothesen geprüft, die als Teil-Hypothesen der Hypothese H_2 aufzufassen sind. Diese Hypothesen lauten:

- Hypothese $H_{21}^{(E)}$: Im Mittel unterscheidet sich das Spreading der reinen Farbstoff-Quaddel nicht von demjenigen der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel, d.h. es gilt $V^{(E)} = V^{(H)}$.
Diese Hypothese wird mit Hilfe der Varianz-Komponente "Zwischen Quaddel-Typen" geprüft.

Hypothese $H_{22}^{(E)}$: Für die reine Farbstoff-Quaddel unterscheidet sich das Spreading zu den beiden Versuchszeiten im Mittel nicht von demjenigen der Kontroll-Quaddel, d. h. es ist $V_k^{(E)} = V_T^{(E)}$. Diese Hypothese wird mit Hilfe der Varianz-Komponente "Zwischen Kontrolle und Versuchszeiten (Farbstoff)" geprüft.

Hypothese $H_{23}^{(E)}$: Zu den beiden Versuchszeiten unterscheidet sich das Spreading der reinen Farbstoff-Quaddel nicht, d. h. $V_1^{(E)} = V_2^{(E)}$. Zur Prüfung dieser Hypothese dient die Varianz-Komponente "Zwischen Versuchszeiten Farbstoff".

Für die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel werden die entsprechenden Hypothesen $H_{22}^{(H)}$ und $H_{23}^{(H)}$ geprüft; hierzu werden die Varianz-Komponenten "Zwischen Kontrolle und Versuchszeiten (Hyaluronidase)" und "Zwischen Versuchszeiten (Hyaluronidase)" verwendet.

Insgesamt bilden die fünf Varianz-Komponenten, die zur Prüfung der hier genannten fünf Teil-Hypothesen herangezogen werden, eine orthogonale Zerlegung der Varianz-Komponente "Zwischen Verfahren".

Eine direkte Schätzung der Parameter, welche zu den einzelnen Verfahren gehören, ist nicht möglich. (Die Gründe hierfür sollen an dieser Stelle nicht diskutiert werden.) Geschätzt werden kann lediglich die Differenz, die zwischen den Parametern besteht, die zu zwei verschiedenen Verfahren gehören. Ist $\bar{x}_i$ für das Verfahren i der Mittelwert der beobachteten Meßwerte und $\bar{x}_k$ für das Verfahren k der Mittelwert der beobachteten Meßwerte, so ist die Mittelwertsdifferenz $\bar{x}_i - \bar{x}_k$ ein Schätzwert für die Differenz zwischen den beiden Parametern V_i und V_k .

Im Hinblick darauf, daß bei der hier vorliegenden Fragestellung im wesentlichen nur die Abweichung von den zugehörigen Kontroll-Quaddeln interessieren, haben wir lediglich die Mittelwertsdifferenzen zwischen den einzelnen Versuchszeiten und den zugehörigen Kontroll-Quaddeln errechnet: $d(t) = \bar{x}(t) - \bar{x}(k)$. Als Schätzwert ist die Mittelwertsdifferenz $d(t)$ mit einem Schätzfehler behaftet, der sich aus dem Versuchsfehler errechnen läßt.

2. Darstellung der Ergebnisse der statistischen Auswertung

Die Ergebnisse der Varianz-Analysen haben wir in den Tabellen 13 bis 24 dargestellt. Die Abkürzungen in den Schemata der Varianz-Analysen haben folgende Bedeutung:

- n: Zahl der Freiheitsgrade der Varianz-Komponente;
 SAQ: Summen-Abstand-Quadrat der Varianz-Komponente;
 MAQ: Mittleres-Abstands-Quadrat der Varianz-Komponente;
 F_{emp} : Varianz-Quotient zwischen der Varianz-Komponente und der Rest-Varianz (nur angegeben, wenn die Varianz-Komponente zahlenmäßig größer als die Rest-Varianz ist);
 p: Überschreitungswahrscheinlichkeit des Varianz-Quotienten F_{emp} in der zugehörigen F-Prüfverteilung, zugleich Irrtumswahrscheinlichkeit beim Verwerfen der zugehörigen Hypothese (nur angegeben, wenn $p \leq 5,0\%$ ist)

Am Fuße der Varianz-Analysen haben wir die Schätzung s der Versuchsstreuung angegeben; aus ihr wurden die 95%-Vertrauensintervalle für die Mittelwertdifferenzen $d(t)$ errechnet. Im zweiten Teil der Tabelle sind für jede Versuchsstufe (Verfahren) die Mittelwerte aus den Beobachtungen an allen 6 Tieren angegeben, einschließlich der zugehörigen 95%-Vertrauensintervalle (Spalte $\bar{x}$). Die Spalte $d(t)$ enthält die Mittelwertsdifferenzen ebenfalls einschließlich der zugehörigen 95%-Vertrauensintervalle. In der Spalte "Sicherung" wurde angegeben, mit welcher Irrtumswahrscheinlichkeit die Aussage behaftet ist, daß $d(t) = 0$ sei (nur angegeben, wenn diese Irrtumswahrscheinlichkeit nicht größer als 5% ist). Die Spalte "Hemmung" schließlich enthält die in üblicher Weise prozentualisierte Hemmung.

3. Diskussion der Ergebnisse der statistischen Auswertung

Versuchsreihe I:

Eine statistisch gesicherte Veränderung im Spreading der reinen Farbstoff-Quaddel zu den Versuchszeiten gegenüber den zugehörigen Kontrollen konnte in dieser Versuchsreihe nicht festgestellt werden.

Auch für die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel ließ sich keine statistisch gesicherte Veränderung im Spreading zu den Versuchszeiten gegenüber den zugehörigen Kontrollen feststellen. Hierzu muß jedoch bemerkt werden, daß in der vorliegenden

den Versuchsreihe die Versuchsstreuung relativ hoch ist; dies kann möglicherweise ein Effekt der geringen Dosierung sein, bei dem sich die unterschiedliche Ansprechbarkeit der Versuchstiere besonders bemerkbar macht.

Versuchsreihe II:

Hier liegen zu den Zeitpunkten 150' und 180' statistisch schwach gesicherte Hinweise dafür vor, daß das Spreading der reinen Farbstoff-Quaddel gegenüber der zugehörigen Kontroll-Quaddel gehemmt ist.

Für die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel liegen für alle Zeitpunkte bis zum Zeitpunkt 120' statistisch ausreichend, bzw. hoch gesicherte Unterschiede im Spreading zu den Versuchszeiten gegenüber den zugehörigen Kontroll-Quaddeln vor. Zu dem Zeitpunkt 180' liegt ebenfalls eine schwache, statistisch gesicherte Hemmung in der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel vor; für den Zeitpunkt 150' dagegen läßt sich eine solche statistische Sicherung nicht erbringen. Das beobachtete Maximum der Hemmung liegt in dieser Versuchsreihe bei dem Zeitpunkt 120'.

Die Versuchsstreuung ist in dieser Versuchsreihe wesentlich kleiner als in der Versuchsreihe I, was für ein wesentlich gleichmäßigeres Ansprechen der Versuchstiere auf die erhöhte Dosis schließen läßt.

Versuchsreihe III:

Eine statistisch gesicherte Veränderung im Spreading der reinen Farbstoff-Quaddel zu den Versuchszeiten gegenüber den zugehörigen Kontrollen läßt sich in dieser Versuchsreihe nicht nachweisen.

Für die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel liegen dagegen ausreichend hoch gesicherte statistische Unterschiede im Spreading zu den Versuchszeiten gegenüber den zugehörigen Kontrollen vor. Das beobachtete Maximum in der Hemmung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel liegt bei dieser Versuchsreihe zum Zeitpunkt 60'; die Größe der maximalen Hemmung entspricht etwa derjenigen, welche in der Versuchsreihe II zu einem anderen Zeitpunkt, nämlich 120', beobachtet wurde. Die zu den Zeitpunkten zwischen 90' und 180' beobachteten Hemmungen in der Ausbreitung der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel

müssen als gleich angesehen werden; statistisch liegen jedenfalls keine Hinweise dafür vor, daß sich die Hemmung zu diesen Zeitpunkten untereinander unterscheiden.

Versuchsreihe IV:

Bei der Diskussion dieser Versuchsreihe beziehen wir auch die Ergebnisse aus einem früheren Versuch mit ein. Eine statistisch gesicherte Veränderung im Spreading der reinen Farbstoff-Quaddel zeigt sich hier nur zum Zeitpunkt 90'; hier liegt eine statistisch hoch gesicherte Hemmung in der Ausbreitung der reinen Farbstoff-Quaddel vor.

Mit Ausnahme der Versuchszeit 180' liegen in dieser Versuchsreihe für die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel zu sämtlichen Versuchszeiten statistisch ausreichend gesicherte Hemmungen in der Ausbreitungsgeschwindigkeit gegenüber den zugehörigen Kontroll-Quaddeln vor. Die maximale Hemmung wird in dieser Versuchsreihe ebenfalls zum Zeitpunkt 60' beobachtet; an dieses Maximum schließt sich ein langsamer Abfall in der Hemmung bis zum Zeitpunkt 180' an.

Dosisabhängigkeit der Wirkung:

Ein exakter Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung läßt sich aus den vorliegenden Versuchen nicht ableiten. Dies liegt im wesentlichen wohl daran, daß sich die Dosierung in zweifacher Hinsicht auswirkt: einmal werden die Wirkungen, die in der Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität zum Ausdruck kommen, mit der Dosis erhöht, zum anderen wird aber auch der zeitliche Ablauf mit der Dosierung verändert. Wegen dieser Verschiebung des zeitlichen Ablaufs ist es nicht möglich, innerhalb der einzelnen Versuchszeiten Dosis-Wirkungsrelationen aufzustellen.

Versuchsreihe Ia: 1 mg Phenylbutazon i. p. / 100 g Tier
(40' und 60')

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	E _{emp}	p
Zwischen Tieren	5	245	49	-	-
Zwischen Lokalisationen	5	862	172	1,62	-
Zwischen Verfahren	5	36.703	7.341	69,25	0,1%
Zwischen Quaddel-Typen	1	35.784	35.784	337,59	0,1%
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (F)	1	34	34	-	-
Zwischen Versuchszeiten (F)	1	252	252	2,38	-
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (H)	1	225	225	2,12	-
Zwischen Versuchszeiten (H)	1	408	408	3,85	-
Rest-Varianz	20	2.114	106		
Gesamtvarianz	35	39.924	1.141		

Versuchsstreuungs $\hat{=}$ 10,3 mm²

Tabelle 13:

Verfahren	$\bar{x}(t)$ mm ²	d(t) mm ²	Sicherung	Hemmung
E _v	92 $\pm$ 8,8			
H _v	162 $\pm$ 8,8			
E40'	90 $\pm$ 8,8	- 2 $\pm$ 12,4	-	-
H40'	148 $\pm$ 8,8	-14 $\pm$ 12,4	-	19,6%
E60'	99 $\pm$ 8,8	+ 7 $\pm$ 12,4	-	-
H60'	160 $\pm$ 8,8	- 2 $\pm$ 12,4	-	2,5%

Versuchsreihe 1b: 1 mg Phenylbutazon i. p. / 100 g Tier
(90' und 120')

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	E_{emp}	p
Zwischen Tieren	5	964	193	1,61	-
Zwischen Lokalisationen	5	664	133	1,11	-
Zwischen Verfahren	5	30.081	6.016	50,13	0,1%
Zwischen Quaddel-Typen	1	30.045	30.045	250,38	0,1%
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (F)	1	25	25	-	-
Zwischen Versuchszeiten (F)	1	0	0	-	-
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (H)	1	3	3	-	-
Zwischen Versuchszeiten (H)	1	8	8	-	-
Rest-Varianz	20	2.405	120		
Gesamtvarianz	35	34.114	975		

Versuchsstreuung $s = 10,9 \text{ mm}^2$

Tabelle 14:

Verfahren	$\bar{x}(t)$ mm^2	$d(t)$ mm^2	Sicherung	Hemmung
E_v	95 $\pm$ 9,3			
H_v	153 $\pm$ 9,3			
$E_{90'}$	95 $\pm$ 9,3	+2 $\pm$ 13,2	-	-
$H_{90'}$	153 $\pm$ 9,3	+0 $\pm$ 13,2	-	+0,0%
$E_{120'}$	95 $\pm$ 9,3	+2 $\pm$ 13,2	-	-
$H_{120'}$	151 $\pm$ 9,3	-2 $\pm$ 13,2	-	2,9%

Versuchsreihe Ic: 1 mg Phenylbutazon i.p. / 100 g Tier
(150' und 180')

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	E _{emp}	p
Zwischen Tieren	5	1.064	213	1,07	-
Zwischen Lokalisationen	5	439	88	-	-
Zwischen Verfahren	5	44.305	8.861	44,53	0,1%
Zwischen Quaddel-Typen	1	43.403	43.403	218,11	0,1%
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (F)	1	69	69	-	-
Zwischen Versuchszeiten (F)	1	208	208	1,05	-
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (H)	1	156	156	-	-
Zwischen Versuchszeiten (H)	1	469	469	2,36	-
Rest-Varianz	20	3.989	199		
Gesamtvarianz	35	49.797	1.423		

Versuchsstreuung $s = 14,1 \text{ mm}^2$

Tabelle 15:

Verfahren	$\bar{x}(t)$ mm^2	$d(t)$ mm^2	Sicherung	Hemmung
E _v	113 $\pm$ 12,0			
H _v	184 $\pm$ 12,0			
E _{150'}	105 $\pm$ 12,0	- 8 $\pm$ 17,0	-	-
H _{150'}	172 $\pm$ 12,0	-12 $\pm$ 17,0	-	17,0%
E _{180'}	113 $\pm$ 12,0	$\pm$ 0 $\pm$ 17,0	-	-
H _{180'}	184 $\pm$ 12,0	$\pm$ 0 $\pm$ 17,0	-	0,0%

Versuchsreihe IIa: 5 mg Phenylbutazon i. p. / 100 g Tier
(40' und 60')

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	E_{emp}	p
Zwischen Tieren	5	395	79	2,93	5,0%
Zwischen Lokalisationen	5	245	108	4,00	5,0%
Zwischen Verfahren	5	38.245	7.649	283,30	0,1%
Zwischen Quaddel-Typen	1	37.056	37.056	1372,44	0,1%
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (F)	1	34	34	1,26	-
Zwischen Versuchszeiten (F)	1	19	19	-	-
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (H)	1	1.003	1.003	37,15	0,1%
Zwischen Versuchszeiten (H)	1	133	133	4,93	5,0%
Restvarianz	20	539	27		
Gesamtvarianz	35	39.424	1.126		

Versuchsstreuung $s = 5,2 \text{ mm}^2$

Tabelle 16:

Verfahren	$\bar{x}(t)$ mm^2	$d(t)$ mm^2	Sicherung	Hemmung
E_v	$88 \pm 4,4$			
H_v	$165 \pm 4,4$			
$E_{40'}$	$90 \pm 4,4$	$+ 2 \pm 6,3$	-	-
$H_{40'}$	$153 \pm 4,4$	$-12 \pm 6,3$	1,0%	16,7%
$E_{60'}$	$93 \pm 4,4$	$+ 3 \pm 6,3$	-	-
$H_{60'}$	$146 \pm 4,4$	$-19 \pm 6,3$	0,1%	25,7%

Versuchsreihe IIb: 5 mg Phenylbutazon i. p. / 100 g Tier
(90' und 120')

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	E_{emp}	p
Zwischen Tieren	5	789	158	4,27	1,0%
Zwischen Lokalisationen	5	87	17	-	-
Zwischen Verfahren	5	46.139	9.228	249,41	0,1%
Zwischen Quaddel-Typen	1	44.100	44.100	1191,89	0,1%
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (F)	1	3	3	-	-
Zwischen Versuchszeiten (F)	1	0	0	-	-
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (H)	1	1.736	1.736	46,92	0,1%
Zwischen Versuchszeiten (H)	1	300	300	8,11	1,0%
Rest-Varianz	20	741	37		
Gesamtvarianz	35	47.756	1.364		

Versuchsstreuung $s = 6,1 \text{ mm}^2$

Tabelle 17:

Verfahren	$\bar{x}(t)$ mm^2	$d(t)$ mm^2	Sicherung	Hemmung
E_v	$87 \pm 5,2$			
H_v	$170 \pm 5,2$			
$E_{90'}$	$86 \pm 5,2$	$- 1 \pm 7,3$	-	-
$H_{90'}$	$154 \pm 5,2$	$-16 \pm 7,3$	1,0%	18,9%
$E_{120'}$	$86 \pm 5,2$	$- 1 \pm 7,3$	-	-
$H_{120'}$	$144 \pm 5,2$	$-26 \pm 7,3$	0,1%	30,8%

Versuchsreihe IIc: 5 mg Phenylbutazon i. p. / 100 g Tier
(150' und 180')

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	E _{emp}	p
Zwischen Tieren	5	1.078	216	2,96	5,0%
Zwischen Lokalisationen	5	912	182	2,49	-
Zwischen Verfahren	5	44.520	8.904	121,97	0,1%
Zwischen Quaddel-Typen	1	43.751	43.751	599,33	0,1%
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (F)	1	400	400	5,48	5,0%
Zwischen Versuchszeiten (F)	1	0	0	-	-
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (H)	1	336	336	4,60	5,0%
Zwischen Versuchszeiten (H)	1	33	33	-	-
Rest-Varianz	20	1.464	73		
Gesamtvarianz	35	47.974	1.371		

Versuchsstreuung $s = 8,6 \text{ mm}^2$

Tabelle 18:

Verfahren	$\bar{x}(t)$ mm ²	d(t) mm ²	Sicherung	Hemmung
E _v	119 $\pm$ 7,3			
H _v	188 $\pm$ 7,3			
E _{150'}	111 $\pm$ 7,3	- 8 $\pm$ 10,3	-	-
H _{150'}	181 $\pm$ 7,3	- 7 $\pm$ 10,3	-	9,9%
E _{180'}	111 $\pm$ 7,3	- 8 $\pm$ 10,3	-	-
H _{180'}	178 $\pm$ 7,3	-10 $\pm$ 10,3	5,0%	14,3%

Versuchsreihe III a: 7,5 mg Phenylbutazon i. p. / 100 g Tier
(40' und 60')

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	E_{emp}	p
Zwischen Tieren	5	1.173	235	4,36	5,0%
Zwischen Lokalisationen	5	490	98	1,81	-
Zwischen Verfahren	5	27.323	5.465	101,20	0,1%
Zwischen Quaddel-Typen	1	24.806	24.806	459,37	0,1%
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (F)	1	56	56	1,04	-
Zwischen Versuchszeiten (F)	1	52	52	-	-
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (H)	1	1.806	1.806	33,44	0,1%
Zwischen Versuchszeiten (H)	1	602	602	11,15	1,0%
Rest-Varianz	20	1.082	54		
Gesamtvarianz	35	30.068	859		

Versuchsstreuung $s = 7,4 \text{ mm}^2$

Tabelle 19:

Verfahren	$\bar{x}(t)$ mm^2	$d(t)$ mm^2	Sicherung	Hemmung
E_v	113 $\pm$ 6,3			
H_v	183 $\pm$ 6,3			
$E_{40'}$	119 $\pm$ 6,3	+ 6 $\pm$ 8,9	-	-
$H_{40'}$	168 $\pm$ 6,3	-15 $\pm$ 8,9	5,0%	21,3%
$E_{60'}$	115 $\pm$ 6,3	+ 2 $\pm$ 8,9	-	-
$H_{60'}$	154 $\pm$ 6,3	-29 $\pm$ 8,9	0,1%	42,5%

Versuchsreihe III b: 7,5 mg Phenylbutazon i. p. / 100 g Tier
(90' und 120')

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	E _{emp}	p
Zwischen Tieren	5	495	99	2,25	-
Zwischen Lokalisationen	5	528	105	2,39	-
Zwischen Verfahren	5	30.562	6.112	138,91	0,1%
Zwischen Quaddel-Typen	1	28.617	28.617	650,39	0,1%
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (F)	1	44	44	1,00	-
Zwischen Versuchszeiten (F)	1	75	75	1,70	-
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (H)	1	1.806	1.806	41,05	0,1%
Zwischen Versuchszeiten (H)	1	19	19	-	-
Rest-Varianz	20	889	44		
Gesamtvarianz	35	32.474	928		

Versuchsstreuung $s = 6,7 \text{ mm}^2$

Tabelle 20:

Verfahren	$\bar{x}(t)$ mm ²	d(t) mm ²	Sicherung	Hemmung
E _v	112 $\pm$ 5,7			
H _v	180 $\pm$ 5,7			
E _{90'}	111 $\pm$ 5,7	- 1 $\pm$ 8,0	-	-
H _{90'}	160 $\pm$ 5,7	-20 $\pm$ 8,0	0,1%	28,4%
E _{120'}	106 $\pm$ 5,7	- 6 $\pm$ 8,0	-	-
H _{120'}	158 $\pm$ 5,7	-22 $\pm$ 8,0	0,1%	31,9%

Versuchsreihe III c: 7,5 mg Phenylbutazon i. p. / 100 g Tier
(150' und 180')

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	E _{emp}	p
Zwischen Tieren	5	273	55	-	-
Zwischen Lokalisationen	5	398	78	-	-
Zwischen Verfahren	5	55.140	11.028	51,06	0,1%
Zwischen Quaddel-Typen	1	53.285	53.285	246,69	0,1%
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (F)	1	84	84	-	-
Zwischen Versuchszeiten (F)	1	2	2	-	-
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (H)	1	1.667	1.667	7,72	5,0%
Zwischen Versuchszeiten (H)	1	102	102	-	-
Rest-Varianz	20	4.316	216		
Gesamtvarianz	35	57.969	1.656		

Versuchsstreuung $s = 14,7 \text{ mm}^2$

Tabelle 21:

Verfahren	$\bar{x}(t)$ mm ²	$d(t)$ mm ²	Sicherung	Hemmung
E _v	111 $\pm$ 12,5			
H _v	198 $\pm$ 12,5			
E _{150'}	107 $\pm$ 12,5	- 4 $\pm$ 17,7	-	-
H _{150'}	181 $\pm$ 12,5	-17 $\pm$ 17,7	5,0%	19,3%
E _{180'}	106 $\pm$ 12,5	- 5 $\pm$ 17,7	-	-
H _{180'}	176 $\pm$ 12,5	-23 $\pm$ 17,7	5,0%	25,8%

Versuchsreihe IVa: 10 mg Phenylbutazon i. p. / 100 g Tier
(40' und 60')

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	E_{emp}	p
Zwischen Tieren	4	1.010	252	13,26	0,1%
Zwischen Lokalisationen					
Zwischen Verfahren	5	44.283	8.856	466,10	0,1%
Zwischen Quaddel-Typen	1	38.387	38.387	2020,36	0,1%
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (F)	1	7	7	-	-
Zwischen Versuchszeiten (F)	1	40	40	2,10	-
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (H)	1	4.839	4.839	254,68	0,1%
Zwischen Versuchszeiten (H)	1	1.020	1.020	53,68	0,1%
Rest-Varianz	20	378	19		
Gesamtvarianz	29	45.671	1.575		

Versuchsstreuung $s = 4,3 \text{ mm}^2$

Tabelle 22:

Verfahren	$\bar{x}(t)_2$ mm	$d(t)_2$ mm	Sicherung	Hemmung
E_v	147 $\pm$ 4,1			
H_v	243 $\pm$ 4,1			
$E_{40'}$	143 $\pm$ 4,1	- 4 $\pm$ 5,7	-	-
$H_{40'}$	215 $\pm$ 4,1	-28 $\pm$ 5,7	0,1%	28,8%
$E_{60'}$	147 $\pm$ 4,1	0 $\pm$ 5,7	-	-
$H_{60'}$	194 $\pm$ 4,1	49 $\pm$ 5,7	0,1%	49,7%

Versuchsreihe IVb: 10 mg Phenylbutazon i. p. / 100 g Tier
(90' und 120')

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	E _{emp}	p
Zwischen Tieren	4	376	94	-	-
Zwischen Lokalisationen					
Zwischen Verfahren	5	20,786	4,157	43,30	0,1%
Zwischen Quaddel-Typen	1	14,874	14,874	154,94	0,1%
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (F)	1	472	472	4,92	5,0%
Zwischen Versuchszeiten (F)	1	96	96	1,00	-
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (H)	1	4,688	4,688	48,83	0,1%
Zwischen Versuchszeiten (H)	1	656	656	6,83	5,0%
Rest-Varianz	20	1,923	96		
Gesamtvarianz	29	23,085	796		

Versuchsstreuung $s = 9,8 \text{ mm}^2$

Tabelle 23:

Verfahren	$\bar{x} \text{ (t)}$ mm^2	$d \text{ (t)}$ mm^2	Sicherung	Hemmung
E _v	154 $\pm$ 9,1			
H _v	216 $\pm$ 9,1			
E _{90'}	139 $\pm$ 9,1	-15 $\pm$ 12,9	1,0%	-
H _{90'}	170 $\pm$ 9,1	-46 $\pm$ 12,9	0,1%	65,5%
E _{120'}	145 $\pm$ 9,1	-9 $\pm$ 12,9	5,0%	-
H _{120'}	186 $\pm$ 9,1	-30 $\pm$ 12,9	0,1%	42,2%

Versuchsreihe IVc: 10 mg Phenylbutazon i.p. / 100 g Tier
(150' und 180')

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	E _{emp}	p
Zwischen Tieren	5	1.103	221	1,74	-
Zwischen Lokalisationen	5	1.212	242	1,91	-
Zwischen Verfahren	5	39,362	7.872	61,98	0,1%
Zwischen Quaddel-Typen	1	37.701	37.701	296,86	0,1%
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (F)	1	84	84	-	-
Zwischen Versuchszeiten (F)	1	352	352	2,77	-
Zwischen Kontr. u. Vers. Zt. (H)	1	1.056	1.056	8,31	1,0%
Zwischen Versuchszeiten (H)	1	169	169	1,33	-
Rest-Varianz	20	2.547	127		
Gesamtvarianz	35	44,224	1.264		

Versuchsstreuung $s = 11,3 \text{ mm}^2$

Tabelle 24:

Verfahren	$\pi(t)$ mm ²	$d(t)$ mm ²	Sicherung	Hemmung
E _v	106 $\pm$ 9,6			
H _v	178 $\pm$ 9,6			
E _{150'}	107 $\pm$ 9,6	+ 1 $\pm$ 13,6	-	-
H _{150'}	158 $\pm$ 9,6	-20 $\pm$ 13,6	1,0%	26,5%
E _{180'}	96 $\pm$ 9,6	-10 $\pm$ 13,6	-	-
H _{180'}	166 $\pm$ 9,6	-12 $\pm$ 13,6	-	16,6%

DISKUSSION

Die Versuche zeigten, daß bei intraperitonealer Phenylbutazon-Applikation 100mg/kg Tier noch eine deutliche, 10 mg/kg Tier dagegen keine sichere Hyaluronidasehemmung machen, während 50 und 75 mg/kg Tier noch eine mäßige Wirkung aufwiesen, die untereinander wohl nicht signifikant verschieden sein dürften. Damit müßte die geringste noch hyaluronidasehemmend wirksame Phenylbutazon-dosis bei intraperitonealer Applikation um 50 mg/kg Tier liegen. Bei Untersuchungen von Ullrich¹⁷ stellte sich heraus, daß bei Beimengungen von 0,002 mg und 0,0002 mg Phenylbutazon zu Farbstoff-Hyaluronidase-Lösung lokal keine Hemmung der durch Hyaluronidase gesteigerten Farbstoffausbreitung verursacht (Mittelwertsdifferenz - 7 mm², bzw. + 2 mm²). Dagegen ergaben 0,008 mg, bzw. 0,014 mg Phenylbutazon als Beimengung zur Farbstoff-Hyaluronidase-Lösung deutliche Hemmwerte von -26 mm², bzw. -23 mm², die in der gleichen Größenordnung liegen, wie sie in unseren Versuchen mit intraperitonealer Injektion von 50 mg, bzw. 75 mg/kg Tier erzielt wurden, und wenn man ein durchschnittliches Rattengewicht von 200 g zu Grunde legt, erhielten die Tiere damit 10 mg, bzw. 15 mg verabreicht. Wenn man eine gleichmäßige Verteilung des injizierten Phenylbutazons annimmt, erscheint es möglich, daß im Quaddelbereich in Versuchsfeld der Bauchhaut etwa die gleiche Menge wirksam wird, die durch direkte Zugabe zur Farbstoff-Hyaluronidase-Lösung eine Hemmung der Hyaluronidaseaktivität in gleicher Größenordnung verursacht. Allerdings ist die Dosisrelation zwischen parenteraler und lokaler Applikation des Phenylbutazons gegenüber der des Natriumsalicylates¹⁸ insofern unterschiedlich, als beim Phenylbutazon lokal vergleichsweise geringere Mengen wirksam sind. Es muß damit diskutiert werden, ob unterschiedliche Resorptionsverhältnisse wegen der subcutanen und intraperitonealen Gabe des Phenylbutazons hier eine Rolle spielen, oder ob dem Phenylbutazon gegenüber dem Natriumsalicylat eine stärkere lokale Wirkung zukommt. Vergleiche unserer Ergebnisse mit der Einwirkung einer Phenylbutazon-Salbe auf das Farbstoff-Hyaluronidase-Spreading ergaben, daß bei Ratten die cutan applizierte Phenylbutazon-Menge sicher quantitativ resorbiert wird¹⁹. Eine lokale Wirkung der Salben-Applikation scheidet aus, da das Versuchsfeld auf der Bauchhaut vom Applikationsort auf der Brusthaut der Ratte durch einen weitreichenden Schnitt operativ getrennt war. Es sind deshalb in diesem Falle nur Allgemeinwirkungen anzunehmen und deshalb auch die Dosen unter diesem Gesichtspunkt zu vergleichen. Bei der Salbenapplikation von 75 mg Phenylbutazon/kg Tier ergab sich ein maximaler Hemmwert von -43 mm², während bei der intraperitonealen Applikation der gleichen Dosis nur ein solcher von -29 mm² gemessen wurde. Damit liegen die Hemmwerte der Salbe näher bei den unter 100 mg/kg Tier bei intraperitonealer Applikation gefundenen Werte, die ein Maximum der Mittel-

wertsdifferenzen von -49 mm^2 zeigt. Somit ist möglicherweise die cutane Resorption noch besser als die intraperitoneale Applikation. Ähnliche Verhältnisse fand Bothner¹⁸ bei Vergleich von subcutaner Natriumsalicylat-Applikation mit einer Natriumsalicylat-Salben-Applikation.

ZUSAMMENFASSUNG

Unter Anwendung eines Farbstoff-Hyaluronidase-Spreading-Testes bei Ratten wurde die Hemmung der Hyaluronidase-Wirkung auf die Farbstoffausbreitung durch Phenylbutazon bei intraperitonealer Applikation festgestellt und die Dosisabhängigkeit der Wirkung ermittelt. Durch Vergleich der bei intraperitonealer und lokaler Applikation hyaluronidasehemmenden Dosen wurde festgestellt, daß eine direkte Einwirkung der Substanz auf die dem Farbstoff beigegebene Hyaluronidase wahrscheinlich ist, und im Falle der lokalen Applikation der Prüfsubstanz eine früher angenommene, über das Nebennierenmark laufende mittelbare Wirkung nicht vorliegt, obwohl auch bei lokaler Applikation die Anwesenheit des Nebennierenmarks erforderlich zu sein scheint. Vergleiche mit einer cutan zugeführten Phenylbutazon-Salbe zeigten, daß das Phenylbutazon vollständig von der Haut aufgenommen zu werden scheint und an getrennten Meßstellen wirksam wird.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Mathies, H. und Jankowski, A.: Klin. Wschr. 35, 1676 (1957)
2. Mathies, H.: Arzneimittelforsch. 8, 233 (1958)
3. Mathies, H.; Glück, A., Poulantras, I. und Schmidt, D.: Med. Exp. 1, 64 (1959)
4. Mathies, H., Biechele, I. und Hartmann, M.: Ärztl. Forschg. XIV, I/160 (1960)
5. Mathies, H.: Zschr. ges. exper. Med. 131, 118 (1959)
6. Mathies, H.: Med. Wschr. 12, 685 (1958)
7. Mathies, H. u. v. Werther, G.: Zschr. angew. Bäder-Klimahk. 5, 503 (1958)
8. Mathies, H. und Gareisen, G.: Med. Klin. 55, 190 (1960)
9. Mathies, H.: Zschr. Rheumaforsch. 18, 308 (1959)
10. Domenjoz, R.: Arch. exper. Path. und Pharmacol. 225, 14 (1955)
11. Sayers, G. und Sayers, M.: Endocrinology 40, 256 (1947)
12. Mathies, H.: Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 64, Kongr. 1958
13. Mathies, H.: Ärztl. Forsch. XII, I/87 (1958)
14. Mathies, H.: Arch. int. pharmacodyn. CXXIII, 334 (1960)
15. Mathies, H.: Naunyn-Schiedebergs Archiv: vide Arch. exp. Path. Pharmacol. 240, 31 (1960)
16. Mathies, H.: Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 65, Kongr. 1959
17. Ullrich, W.: Dissertation München
18. Bothner, I.: Dissertation München 1963
19. Mathies, H. und Will, E., Nath, M., Schüle, V. im Manuskript

Abschließend danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Mathies für die Überlassung des Themas und Herrn Prof. Dr. W. Seitz für die Möglichkeit meine Dissertation an seiner Klinik zu bearbeiten.

Herrn Dipl.-Math. K. Liebrich möchte ich für die statische Auswertung der Versuchsergebnisse danken.

Lebenslauf

Ich (Mahendra Nath) wurde am 30. Juni als erstes Kind meines Vaters, Karan Singh, und meiner Mutter, Chironja Bai, zu Ataria (Sitapur, U.P., Indien) geboren. Mein Vater ist Landwirt in Etmadpur, meine Mutter ist schon sehr früh gestorben. Im Alter von 7 Jahren kam ich zur Schule und verbrachte meine gesamte Schul- und Hochschulzeit im Internat an der Gurukula Universität in Hardwar. Nach Beendigung widmete ich mich von 1948 - 1953 ebenfalls an der Gurukula Universität meinem Studium in Ayurveda (Indische Medizin). Im Winter legte ich dort mein staatlich anerkanntes Schlußexamen ab. Danach faßte ich den Entschluß, nach Deutschland zu gehen, um die Fortschritte der westlichen Medizin zu erlernen und zu vergleichen. Später erhielt ich zum Winter-Semester 1954/55 die Zulassung zum Studium an der Medizinischen Fakultät der Universität München. Dank der großzügigen Gewährung verschiedener Stipendien und Darlehen von Seiten des Ludwig-Missions-Vereins, des Bayerischen Kultusministeriums und Indien-Instituts war es mir möglich, im Sommer 1959 meine ärztliche Vorprüfung abzulegen und 1966 mein Staatsexamen zu machen. Leider konnte ich wegen meiner Erkrankungen nicht früher für Examen melden. An dieser Stelle möchte ich noch einmal für all die vielen Hilfen und Unterstützungen danken, die mir während meines Studienaufenthaltes in Deutschland zuteil wurden, ohne die ich kaum mein Ziel hätte erreichen können.

